



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Elaboración de Códigos de Barras de DNA de
musarañas (Eulipotyphla: Soricidae) de Oaxaca**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

IA LARISA MONTES DE OCA SERVÍN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA

LICENCIATURA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Fernando y Lina, muchas gracias por su apoyo y paciencia durante toda la carrera y en todo este proceso, aprecio mucho el esfuerzo que también significó para ustedes. Por darme todo en la vida, sin ustedes no habría logrado llegar hasta aquí y sobre todo por siempre cuidarme y quererme mucho. Igualmente agradezco a Dení por su ayuda y compañía en todo momento. Los amo a los tres.

A toda mi familia, a mis abuelos Cristina y Felipe. Especialmente a Mariana y a mis tíos Mary y Felipe por recibirme en su casa, muchas gracias.

A David, mil gracias por todo el tiempo, apoyo y principalmente por el amor que me has dado en todo este tiempo juntos. Quisiera agradecer a mis amigos por hacer de la carrera y de mis días algo más agradable con sus pláticas, tonterías y compañía.

Al Dr. Fernando quisiera agradecerle por haberme aceptado como su alumna, por todas sus recomendaciones, conocimiento y guía ofrecidos a lo largo de este proceso. También, quisiera agradecer a las maestras Yolanda y Julieta por su ayuda y enseñanzas, y a todos en la colección.

A la M. en C. Andrea R. Jiménez Marín por su atención brindada en el laboratorio, a la Dra. Verónica Farías González, a la M. en C. Leticia A. Espinosa Ávila y al M. en C. Tizoc A. Altamirano Álvarez por sus observaciones y ayuda manifestada en la realización de la tesis. Muchas gracias a todos mis asesores y nuevamente agradezco al Dr. Fernando A. Cervantes Reza.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todo lo necesario para poder desarrollarme académicamente desde el CCH hasta este momento.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, al Instituto de Biología y a la Colección Nacional de Mamíferos por ser parte fundamental en mi formación como bióloga.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
Familia Soricidae	3
Estudios previos en musarañas	6
Códigos de barras	8
II. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivos particulares	10
III. MATERIALES Y MÉTODO	11
3.1 Obtención de tejidos.....	11
3.2 Extracción, amplificación y secuenciación de DNA.....	11
3.3 Análisis de secuencias.....	13
3.4 Elaboración de matrices genéticas y árbol	13
3.5 Base de datos	13
IV. RESULTADOS.....	15
4.1 Base de datos	15
4.2 Extracción y secuenciación.....	17
4.3 Distancias genéticas	19
4.4 Árbol de distancias	21
4.5 BOLD Systems	23
V. DISCUSIÓN.....	24
5.1 Fenograma y distancias genéticas.....	24
VI. CONCLUSIONES	32
LITERATURA CITADA	33
APÉNDICES.....	38
Apéndice 1.....	38
Apéndice 2.....	40
Apéndice 3.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Cladograma y tiempos de divergencia de Soricidae (musarañas), Erinaceidae (erizos), Talpidae (topos) y Solenodontidae (solenodontes)..... 3
- Figura 2. Fotografías tomadas a un ejemplar de la especie *Cryptotis peregrinus* (CNMA 49064)..... 16
- Figura 3. Gel de agarosa al 1 % donde se aprecia el DNA extraído de ejemplares de musarañas 17
- Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % donde se muestra los amplicones del gen mitocondrial COI..... 18
- Figura 5. Ejemplo de tres electroferogramas obtenidos para tres distintas especies estudiadas 19
- Figura 6. Árbol NJ construido con 45 secuencias de distintas especies de musarañas de los géneros *Cryptotis* y *Sorex*, de la subfamilia Crocirudinae, las familias Erinaceidae y Talpidae y del Orden Chiroptera 22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Listado de especies de musarañas del estado de Oaxaca, nombre común, distribución y estado de conservación	6
Cuadro 2. Primers empleados en la amplificación del COI	12
Cuadro 3. Condiciones óptimas para la reacción en el PCR.....	12
Cuadro 4. Cuantificación del DNA extraído de los tejidos estudiados de musarañas	18
Cuadro 5. Promedio de distancias genéticas entre ejemplares de la misma especie	20
Cuadro 6. Promedios de distancias genéticas obtenidos entre especies hermanas de musarañas	20
Cuadro 7. Promedio de distancias genéticas entre distintas especies de musarañas de los géneros <i>Cryptotis</i> y <i>Sorex</i>	20
Cuadro 8. Promedio de distancias genéticas entre especies de musarañas y especies de los géneros <i>Blarina</i> y <i>Megasorex</i> , así como entre especies de la subfamilia Crocidurinae, de la familia Erinaceidae y Talpidae y del Orden Chiroptera	21

RESUMEN

Las musarañas (Soricidae) son mamíferos pequeños parecidos a un ratón que se encuentran distribuidos en gran parte del territorio nacional, siendo Oaxaca uno de los estados con mayor número de especies. A pesar de su amplia distribución y diversidad existen factores que obstaculizan el estudio de esta familia, como es la dificultad al momento de identificar morfológicamente a los ejemplares. Por tanto, en el presente trabajo se planteó elaborar códigos de barras de DNA de distintos ejemplares de musarañas pertenecientes al estado de Oaxaca. Para elaborarlos se usaron 15 ejemplares catalogados dentro de la Colección Nacional de Mamíferos, de las especies: *Cryptotis magnus*, *C. mexicanus*, *C. peregrinus*, *C. pueblensis*, *Sorex ventralis* y *S. veraepacis*. Se obtuvieron muestras de DNA y se amplificó mediante PCR la subunidad I del gen mitocondrial citocromo oxidasa c (COI). Las secuencias genéticas se editaron y alinearon manualmente para obtener una secuencia consenso de cada ejemplar. Con las secuencias se obtuvo un árbol Neighbor- Joining y mediante el modelo de sustitución K2P se realizó una matriz con las distancias genéticas. Las distancias intraespecíficas fueron menores a las distancias interespecíficas, las identificaciones morfológicas y las obtenidas del COI coincidieron totalmente en 14 ejemplares y en un ejemplar sólo se pudo asegurar la identificación hasta nivel de género. Finalmente, se generaron ejemplares voucher y las secuencias se pusieron a disposición del público en la plataforma BOLD Systems dentro del proyecto EUL Mexican shrews. En conclusión, los códigos de barras de DNA generados servirán para facilitar y complementar las identificaciones taxonómicas en ejemplares colectados en campo y aquellos resguardados en colecciones científicas.

Palabras clave: musarañas, código de barras, COI, secuencia genética

I. INTRODUCCIÓN

El orden Eulipotyphla cuenta con aproximadamente 500 especies y actualmente se encuentra conformado por erizos (Erinaceidae), solenodontes (Solenodontidae), musarañas (Soricidae) y topos (Talpidae). Comparten ciertas características morfológicas, como, los ojos reducidos o ausentes, las orejas pequeñas y un hocico alargado y estrecho. En su mayoría las especies de este orden son de hábitos terrestres. Sin embargo, en la familia de los topos existe un gran número de especies fosoriales, esto quiere decir, que están adaptadas a la vida subterránea y algunas semi acuáticas como es el caso del topo de nariz estrellada (*Condylura cristata*). La distribución del orden es bastante amplia y sus especies se pueden encontrar en casi todos los continentes y hábitats alrededor del mundo a excepción de Australia y las zonas Árticas (Symonds, 2005; Douady y Douzery, 2009; Guevara *et al.*, 2015; Woodman, 2018).

El estudio científico de este grupo por mucho tiempo ha estado enfocado a su origen y evolución, durante el siglo pasado el establecimiento de su clasificación taxonómica y su historia filogenética resulto ser problemático y estar envuelto de controversia, esta incertidumbre surgió por la falta de caracteres compartidos. Por otro lado, existe evidencia morfológica que sugiere que el orden Eulipotyphla sea un grupo monofilético, lo que significa que los integrantes de este grupo provienen de un ancestro común. Algunas de estas evidencias son 6 características morfológicas, siendo la primera de ellas la ausencia de caecum, la reducción de la sínfisis púbica, la expansión del maxilar sin órbita y el desplazamiento del palatino, una probóscide móvil, la reducción del hueso yugal o cigomático y una placenta hemocorial (Stanhope *et al.*, 1998; Symonds, 2005, Guevara *et al.* 2014).

El origen del orden Eulipotyphla se remonta a la era del Mesozoico hace aproximadamente 73 millones de años (Fig 1); su diversificación empezó cuando los topos divergieron de la familia Solenodontidae, ésta última quedando como grupo basal. Posteriormente en el límite del periodo Cretácico y del Paleógeno (55 m.a.) ocurrió la división de los erizos y las musarañas. Las subfamilias actuales se empezaron a originar durante la época del Eoceno, siendo las subfamilias Soricinae y Crocidurinae las últimas en aparecer (38 m.a.), ambas pertenecientes a la familia Soricidae (Douady y Douzery, 2003; Douady y Douzery, 2009).

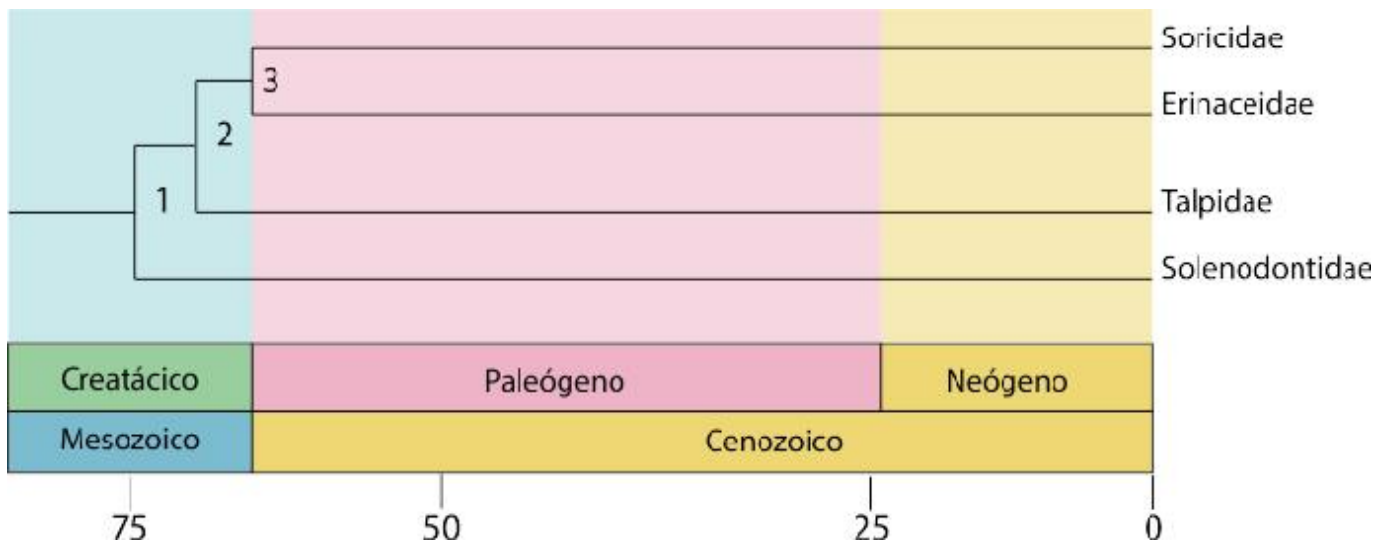


Fig 1. Cladograma y tiempos de divergencia de Soricidae (musarañas), Erinaceidae (erizos), Talpidae (topos) y Solenodontidae (solenodontes); (Recuperado de Douady y Douzery, 2009).

Familia Soricidae

Los miembros de la familia Soricidae (musarañas) se caracterizan por tener el rostro alargado, los ojos pequeños, el hocico puntiagudo, los incisivos alargados y de forma curvada con dos cúspides principales, el pelaje corto y suave de coloración variable, poseen un cóndilo doble en la articulación temporal mandibular y ausencia de arcos cigomáticos y bula timpánica. Respecto a sus sentidos, el de la vista es deficiente, mientras que los sentidos del tacto, olfato y acústico se

encuentran bien desarrollados, incluso algunas especies hacen uso de la ecolocalización para desplazarse y ubicar a sus presas. Por lo general, son organismos solitarios con excepción de la época reproductiva donde una hembra puede llegar a tener hasta tres crías por camada con periodos de gestación que duran de 20 a 30 días. (Hutterer, 1985; Santos *et al.*, 2000; Symonds, 2005; Guevara *et al.*, 2015).

Las musarañas presentan un tamaño que va de los 6 a los 30 cm y un peso que oscila de los 2 hasta los 180 g. Algunas especies de esta familia son consideradas como los mamíferos más pequeños del mundo debido a su reducido tamaño. A razón de lo anterior, las tasas metabólicas en este grupo son altas en comparación a otras especies de mamíferos, es por esto que presentan actividad tanto en el día como en la noche, tiempo que dedican a la búsqueda de su alimento que se encuentra entre la hojarasca, las rocas y debajo de troncos caídos llegando a consumir en un solo día el equivalente a dos veces su peso corporal. Su dieta se basa principalmente en insectos pequeños, aunque en algunas ocasiones llegan a consumir otros invertebrados como lombrices, moluscos, cangrejos e incluso pequeños vertebrados como peces y ratones. (Hutterer, 1985; Santos *et al.*, 2000; Guevara *et al.*, 2015).

La diversidad de especies de la familia Soricidae es bastante amplia, por lo que se le considera la tercera familia más diversa de mamíferos en el mundo (Ohdachi *et al.*, 2006). En la actualidad existen alrededor de 376 especies descritas, las cuales se encuentran distribuidas en tres subfamilias y 26 géneros. La subfamilia que cuenta con el mayor número de géneros es Soricinae con 14,

después Crocidurinae con 9 y por último Myosoricinae con 3 (Willows-Munro y Matthee, 2011).

En México se tiene registro de 4 géneros de musarañas (*Cryptotis*, *Megasorex*, *Notiosorex* y *Sorex*) todos pertenecientes a la subfamilia Soricinae, 3 tribus (Blarinini, Notiosoricini y Soricini) y 40 especies (Carraway, 2007; Guevara *et al.*, 2015; Guevara, 2017). Los géneros *Cryptotis* y *Sorex* cuentan con el mayor número de especies e inclusive llegan a ser de los géneros de mamíferos más diversos en México. Dentro de estos géneros las especies colectadas con mayor frecuencia son *Cryptotis parvus*, *C. mexicanus*, *Sorex saussurei* y *S. oreopolus* (Ceballos y Arrollo-Cabrales, 2012; Sánchez-Cordero *et al.*, 2014).

Dentro del territorio mexicano, los hábitats en los que se distribuyen las musarañas son diversos, se les puede encontrar tanto en desiertos como en bosques, así como en diferentes altitudes que van desde el nivel del mar hasta las partes altas de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental (Carraway, 2007; Guevara *et al.*, 2015). Los estados que cuentan con la mayor diversidad de especies de musarañas son Chiapas, Jalisco y Oaxaca, a diferencia de los estados de Campeche y Tabasco en donde no se tiene registro de ninguna especie hasta la fecha (Santos *et al.*, 2000). En el estado de Oaxaca se encuentran 3 géneros (*Cryptotis*, *Sorex* y *Megasorex*) con aproximadamente 12 especies de las cuales 11 son especies endémicas del territorio mexicano y 3 de ellas son exclusivas de Oaxaca (Cuadro 1); (Santos-Moreno, 2014; Briones-Salas *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Listado de especies de musarañas del estado de Oaxaca, nombre común, distribución (*: Endémica de Oaxaca) y estado de conservación: NOM (NOM-059-SEMARNAT-2010): A: amenazada, E: probablemente extinta en medio silvestre, P: peligro de extinción, Pr: sujeta a protección especial; IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza): CR: peligro crítico, EN: en peligro, EW: extinta en vida silvestre, NT: casi amenazada, VU: vulnerable.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	DISTRIBUCIÓN	NOM	IUCN
<i>Cryptotis goldmani</i>	musaraña tropical de la Sierra Madre del Sur	México	Pr	
<i>Cryptotis magnus</i>	musaraña tropical gigante	México*	Pr	VU
<i>Cryptotis mexicanus</i>	musaraña tropical mexicana	México		
<i>Cryptotis pueblensis</i>	musaraña	México		
<i>Cryptotis peregrinus</i>	musaraña tropical de Oaxaca	México*	Pr	
<i>Cryptotis phillipsii</i>	musaraña tropical de la sierra sur de Oaxaca	México*		VU
<i>Megasorex gigas</i>	musaraña gigante	México	A	
<i>Sorex ixtlanensis</i>	musaraña de la Sierra Madre del Sur	México		
<i>Sorex macrodon</i>	musaraña de dientes grandes	México	A	VU
<i>Sorex ventralis</i>	musaraña de vientre castaño	México		
<i>Sorex veraecrucis</i>	musaraña de Veracruz	México	A	
<i>Sorex veraepacis</i>	musaraña de las tierras altas del sur	México y Guatemala	A	

Estudios previos en musarañas

Las musarañas han sido poco estudiadas y no se cuenta con mucha información referente a ellas. Los factores que han limitado su estudio se relacionan en gran medida a la dificultad en su captura y a su compleja identificación. La falta de estudios y de ejemplares en colecciones biológicas ha mermado la información disponible, por lo tanto, la riqueza taxonómica, la abundancia de poblaciones y la distribución geográfica del grupo aún no es del todo precisa, por ende, el estado de conservación de algunas especies es aún incierto (Sánchez-Cordero *et al.*, 2014; Guevara *et al.*, 2015).

Uno de los acercamientos que se le ha dado al estudio de musarañas es a nivel filogenético con el fin de evaluar la diversidad del grupo y las relaciones de parentesco entre distintas especies, los resultados obtenidos en dichos estudios se han logrado gracias a la obtención de datos morfológicos y moleculares. Entre los marcadores moleculares frecuentemente usados encontramos a los fragmentos de DNA mitocondrial que pueden ser empleados como un método complementario en las identificaciones morfológicas, debido a que en ciertas especies los caracteres morfológicos resultan homogéneos y difíciles de distinguir en las distintas etapas del desarrollo de las musarañas, complicando su identificación (Dubey *et al.*, 2007; Esteva *et al.*, 2010; Jaquet *et al.*, 2012; Guevara y Cervantes, 2013).

Marcadores moleculares como el gen de la subunidad 16S RNA ribosomal (16S), el gen mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) y el gen de la subunidad I del citocromo oxidasa *c* (COI) se han usado anteriormente en trabajos relacionados con musarañas. Por ejemplo, se han realizado filogenias con el fin de estudiar las relaciones taxonómicas entre algunas familias, así como entre especies, de igual manera para entender su evolución, tiempo de divergencia e historia biogeográfica de varias especies (Dubey *et al.*, 2007; Esteva *et al.*, 2010; Guevara y Cervantes, 2014). También se han utilizado como apoyo en la taxonomía del grupo, en algunos estudios se emplearon para discriminar o confirmar la identidad de ciertas especies y así conocer su diversidad genética (Bannikova *et al.*, 2011; Jaquet *et al.*, 2012). En el caso particular de México esto se ha probado en especies del género *Sorex* y *Cryptotis* (Esteva *et al.*, 2010; Guevara y Cervantes, 2014).

Código de Barras de DNA

En estudios relacionados con diversidad, taxonomía y sistemática encontramos que el código de barras de DNA ha mostrado ser una herramienta útil para la identificación de especies. Los códigos de barras son una región corta y estandarizada de DNA, la cual nos permite llevar a cabo identificaciones taxonómicas de manera rápida y eficaz. Esta región consiste en un fragmento de aproximadamente 648 pb de la subunidad I gen mitocondrial citocromo oxidasa c (COI), que se encuentra presente en todos los organismos y es específica para cada especie gracias a su alta tasa de sustitución (Hebert *et al.*, 2003a; Paz *et al.*, 2011; Kress *et al.*, 2014; Altamirano-Benavides y Yáñez, 2016).

Para que una secuencia de DNA considerada código de barras genético tenga cierta validez y pueda ser incluida en una base de datos, como es el caso de BOLD Systems (The Barcode of Life Data System), ésta tiene que cumplir con ciertas condiciones. En principio, cada secuencia tiene que contar por lo menos con tres aislados por especie, las secuencias analizadas deben tener la misma longitud, los organismos estudiados tienen que ser previamente identificados morfológicamente a nivel de especie, se tiene que contar con toda la información taxonómica del ejemplar voucher y los datos referentes a su colecta. Además, las distancias genéticas intraespecíficas tienen que ser menores a las distancias interespecíficas y su ubicación dentro de un árbol filogenético o fenograma debe estar asociada a un cluster junto con secuencias de la misma especie o de especies hermanas (Vera *et al.*, 2012).

La eficiencia de los códigos de barras de DNA se ha mostrado a la hora de complementar o rectificar de manera precisa alguna identificación taxonómica, esto

se debe a que es un método que puede ser utilizado en cualquier etapa del ciclo de vida de un organismo, en ejemplares que han sufrido algún daño o en tejidos pertenecientes a una colección científica. Los códigos de barras resultan de gran utilidad a la hora de comprobar la identidad y pureza de especies con importancia económica o en el caso de la agricultura, al momento de detectar especies causantes de plagas. De igual manera se han aplicado de manera exitosa en estudios relacionados con la ecología, la conservación y la biodiversidad (Kress y Erickson, 2012; Márquez, 2015). Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Cervantes *et al.* (2010) donde el uso del código de barras resultó de gran utilidad al momento de comprobar la identidad de dos especies de tlacuaches (*Didelphis virginiana* y *Didelphis marsupialis*), estas especies muestran una distribución simpátrica y en algunos casos su identificación taxonómica ha resultado complicada debido a la variabilidad que existe en ejemplares de la misma especie, así como a la similitud morfológica de ambas especies.

Como se mencionó anteriormente, factores como la falta de ejemplares o la dificultad que en algunos casos se presenta al momento de identificar morfológicamente a las especies, han ocasionan que el estudio de la familia Soricidae se vuelva complicado. Por este motivo se propone la creación de nuevos Códigos de Barras de DNA, los cuales servirían para agilizar y facilitar la identificación taxonómica de ejemplares en campo o de aquellos pertenecientes a una colección científica, representando un avance en la investigación y un parteaguas a futuros trabajos en el país con respecto a este grupo de mamíferos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo principal generar Códigos de Barras de DNA mitocondrial de distintos ejemplares de la familia Soricidae pertenecientes al estado de Oaxaca, México.

2.2 Objetivos particulares

- Obtener secuencias de DNA mitocondrial de ejemplares de musarañas (Soricidae).
- Generar una base de datos con la información de los ejemplares voucher.
- Anexar los Códigos de Barras a la plataforma de BOLD Systems.

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Obtención de tejidos

Se utilizaron muestras de tejido muscular obtenidas de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM. Se usaron 15 ejemplares de las especies *Cryptotis magnus*, *Cryptotis mexicanus*, *Cryptotis peregrinus*, *Cryptotis pueblensis*, *Sorex ventralis* y *Sorex veraepacis*. Los ejemplares seleccionados fueron colectados en distintas localidades del estado de Oaxaca en agosto del 2013 y en julio y agosto del 2017. Toda su información taxonómica y de colecta se encuentra en la base de datos de la CNMA; también cuentan con un número único de catálogo y una identificación morfológica previa. De cada tejido congelado se obtuvo una fracción de aproximadamente 1 mm³ de muestra, la cual se guardó en un tubo Eppendorf (2 ml) y se mantuvo en refrigeración hasta su utilización.

3.2 Extracción, amplificación y secuenciación de DNA

Las extracciones de DNA genómico se realizaron a partir del tejido previamente obtenido y con ayuda del kit comercial de Bio Basic (EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit, No. Cat. BS628); se procedió con la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia del DNA se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100V por 30 min; a cada pozo se le agregó 1 µl de GelRed y 3 µl de muestra de DNA. La concentración de DNA fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, No. serie 6455) y se expresó en µg/µl.

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de aproximadamente 700 pb del gen de la subunidad I del citocromo

oxidasa *c* (COI) empleando los primers (cebadores) VF1_t1 y VR1_t1 (Cuadro 2), el programa utilizado en el termociclador fue VF VR (Cuadro 3) y se usaron volúmenes de 10.7 µl de H₂O pura, 3 µl de Buffer (5x), 0.12 µl del primer F (10 mM), 0.12 µl del primer R (10 mM), 0.06 de *Taq* Polimerasa (5 µ/µl) y 1 µl de DNA; con un volumen final de 15 µl por muestra. La correcta amplificación del COI se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, que se corrió a 100V por 30 min, se utilizó un marcador molecular de 100 pb y en cada pozo se colocó 1 µl de GelRed y 3 µl del producto del PCR. Posteriormente los productos del PCR se mandaron a secuenciar empleando el primer M13 al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología (IBUNAM).

Cuadro 2. Primers empleados en la amplificación del COI.

PRIMERS	SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS 5'-3'	REFERENCIA
VF1_t1	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGAC ATTGG	Ivanova <i>et al.</i> , 2010
VR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAG AATCA	

Cuadro 3. Condiciones óptimas para la reacción en el PCR.

PROGRAMA	TEMPERATURA (C°)	TIEMPO (s)	CICLOS	PROCESO
VFVR	94	60	1	Desnaturalizar
	94	30	5	Desnaturalización
	50	40		Alineación
	72	60		Extensión
	94	30	30	Desnaturalización
	55	40		Alineación
	72	60		Extensión
	72	300	1	Extensión final
	4	∞		

3.3 Análisis de secuencias

Una vez obtenidos los electroferogramas (representaciones gráficas de las secuencias) se revisaron y se compararon las secuencias con ayuda de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para confirmar que estas fueran semejantes a otras disponibles para el gen COI en musarañas de otras especies. Posteriormente las secuencias fueron editadas y alineadas manualmente con ayuda del software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.6 (Hall, 1999) y se obtuvo una secuencia consenso para cada ejemplar.

3.4 Elaboración de matrices genéticas y árbol

El árbol de distancias se realizó usando el software MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Kumar *et al.*, 1994) siguiendo el método de Neighbor-Joining (NJ; Saitou y Nei, 1987). Para elaborarlos se utilizaron las secuencias generadas en este trabajo de las especies: *Cryptotis magnus*, *C. mexicanus*, *C. peregrinus*, *C. pueblensis*, *Sorex veraepacis* y *S. ventralis*. De las especies antes mencionadas, se obtuvieron secuencias de sus especies hermanas de BOLD Systems (The Barcode of Life Data System), al igual que de otros grupos de la familia Soricidae, del orden Eulipotyphla y un grupo externo como referencia (Chiroptera). Para calcular las distancias genéticas se usó el modelo de sustitución de nucleótidos 2 parámetros de Kimura (K2P;1980) y con la matriz obtenida de todas las distancias se sacaron algunos promedios de interés.

3.5 Base de datos

En una base de datos se incorporó información taxonómica, datos de colecta y fotografías de cráneo y piel de cada uno de los ejemplares empleados en este trabajo, de igual manera se creó una matriz con todas las secuencias editadas. Los

códigos de barras de DNA y toda la información del ejemplar voucher se subió a la base de datos de BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org/index.php/>).

IV. RESULTADOS

4.1 Base de datos

Se elaboró una base de datos en la que se incluyó información de los ejemplares voucher elaborados en este trabajo, y de los que se generó una secuencia genética. La base de datos cuenta con el número de catálogo de la CNMA, número de colecta, sexo, información taxonómica (género y especie), datos geográficos del sitio de colecta (estado, localidad, poblado, municipio, elevación y coordenadas), fecha y tipo de preservación (Apéndice 1). También se tomaron fotografías de piel (vista dorsal) y de cráneo (vista dorsal, ventral y lateral) de cada ejemplar (Fig. 2). Todos los datos y ejemplares voucher generados en este trabajo quedan a libre disposición de quien los solicite.

Se creó una biblioteca de referencia con 30 secuencias descargadas de BOLD Systems, mismas que sirvieron para la obtención de distancias genéticas y elaboración del árbol. Además, para estas secuencias se generó una base de datos en la que se incorporó el número de acceso, información taxonómica (orden, familia y especie), localidad (país y región), número de catálogo y la colección donde se encuentra el ejemplar (Apéndice 2).

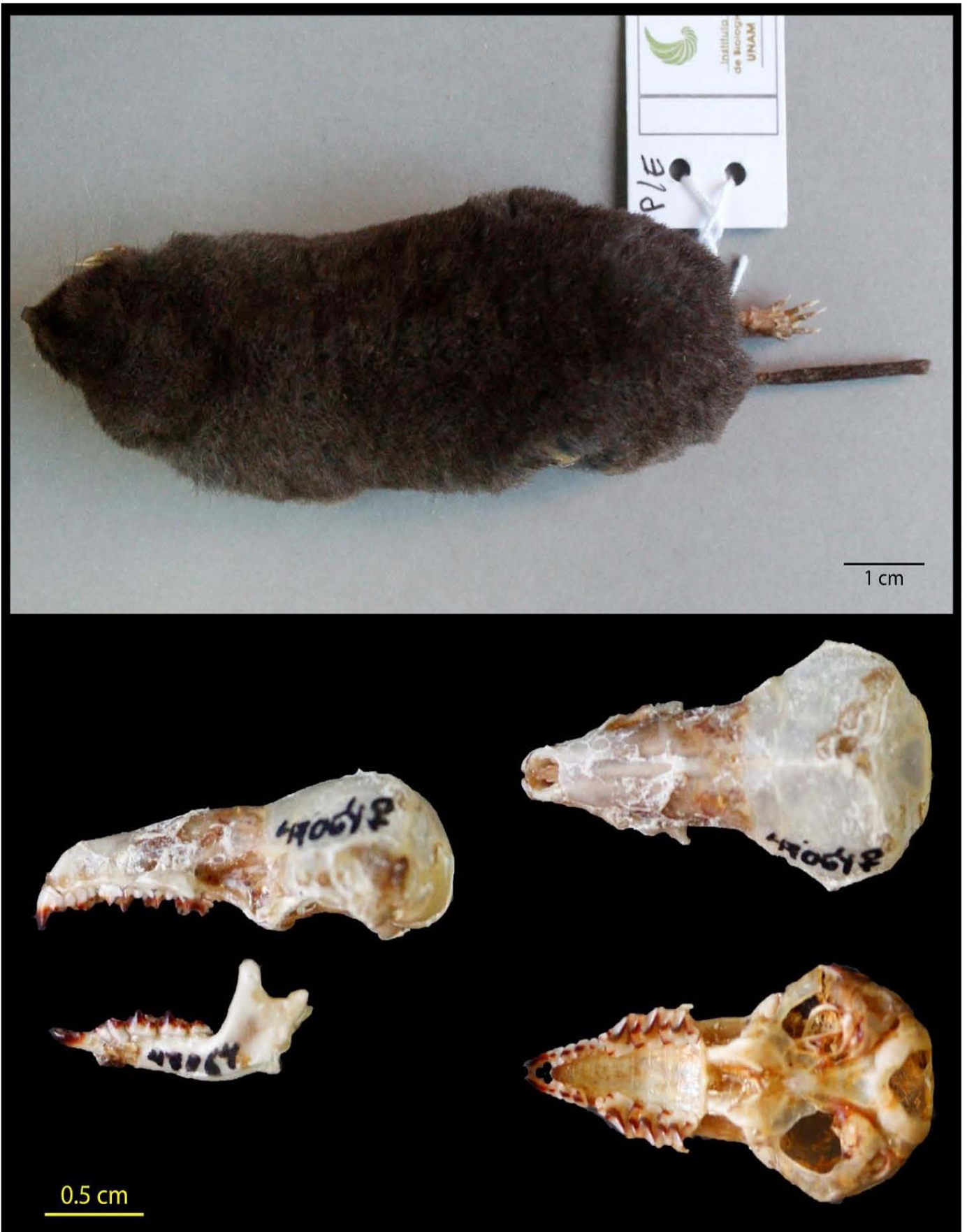


Fig 2. Fotografías de un ejemplar en piel de la especie *Cryptotits peregrinus* (CNMA 49064). Superior: vista dorsal de la piel del ejemplar; Inferior: cráneo en vista lateral, dorsal y ventral.

4.2 Extracción y secuenciación

El DNA genómico se extrajo de 15 ejemplares de seis especies diferentes de musarañas, en el gel de agarosa (Fig. 3) fue posible observar las bandas de DNA. En lo que respecta a la cuantificación de DNA, todas las muestras mostraron valores superiores a los 5 ng/ μ l (Cuadro 4). Como resultado de la amplificación se obtuvieron fragmentos del COI (Fig. 4). De la secuenciación resultaron un total de 30 electroferogramas que variaron entre los 400 a 800 pb (Fig. 5). Con las secuencias Forward de cada ejemplar se realizó un BLAST donde se obtuvieron porcentajes de identidad del 86 al 90 % con otras especies de los géneros *Cryptotis* y *Sorex*. Las secuencias Forward y las Reverse fueron editadas y alineadas, para finalmente generar una secuencia consenso de cada ejemplar. Para los análisis posteriores se emplearon las 15 secuencias consenso y otras secuencias descargadas de BOLD Systems.

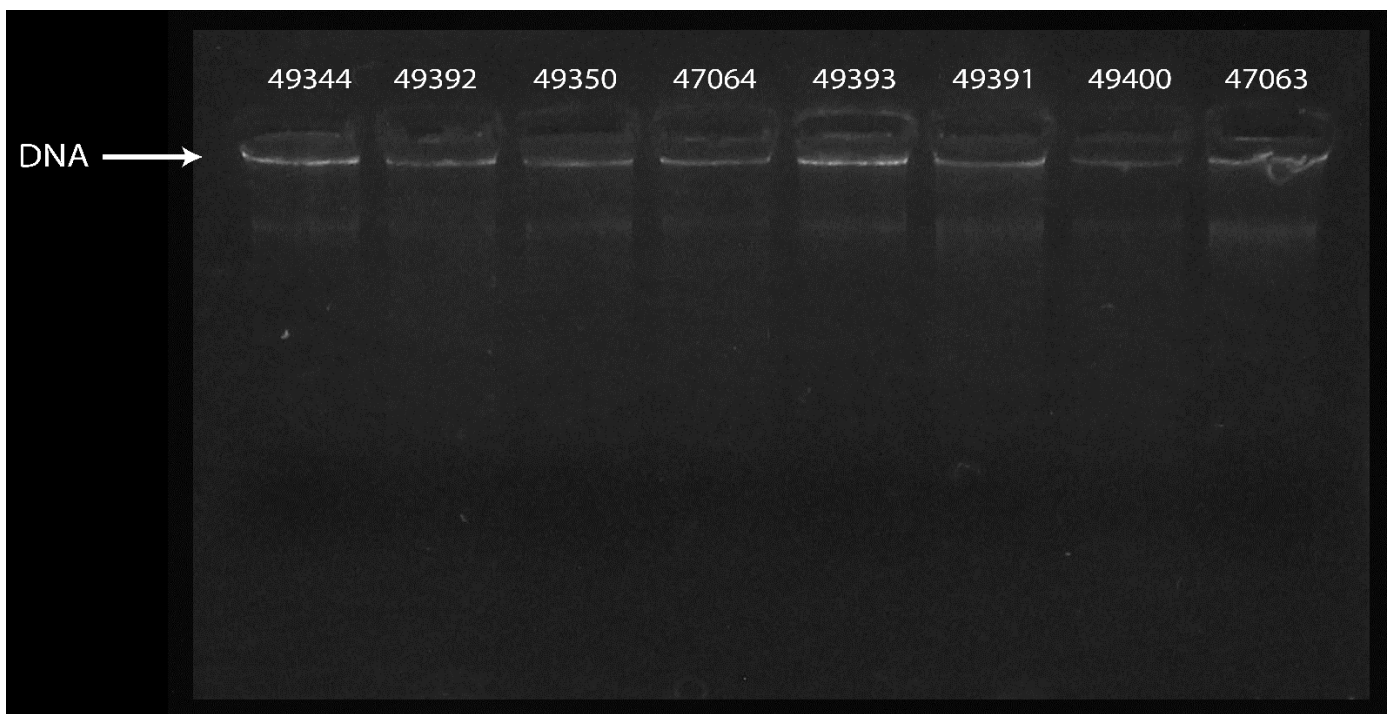


Fig 3. Gel de agarosa al 1 % donde se aprecia el DNA extraído de ejemplares de musarañas. Número de catálogo de la CNMA: 49344 (*C. mexicanus*), 49392 (*S. ventralis*), 49350 (*C. mexicanus*), 47064 (*C. peregrinus*), 49393 (*S. ventralis*), 49391 (*S. ventralis*), 49400 (*S. veraepacis*) y 47063 (*C. pueblensis*).

Cuadro 4. Cuantificación del DNA extraído de los tejidos estudiados de musarañas.

MUESTRA	DNA (ng/ul)
49311	5.6
49312	58.9
49310	19.2
49344	22.6
49345	197.5
49350	23.8
47063	23.3
47064	17.0
47066	129.3
49393	25.2
49392	6.7
49391	46.7
49400	22.4
49401	200.4
49399	138.5

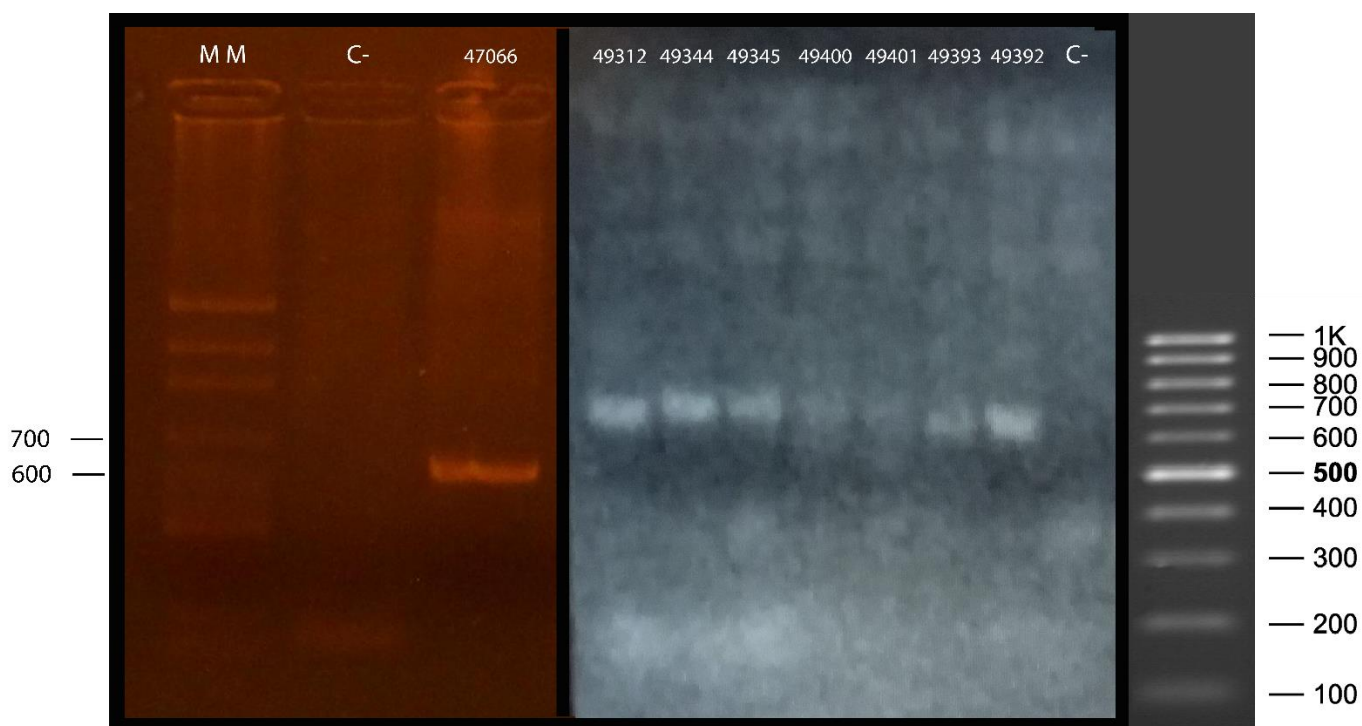
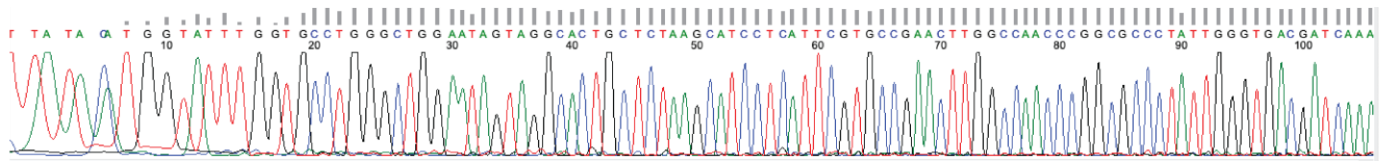


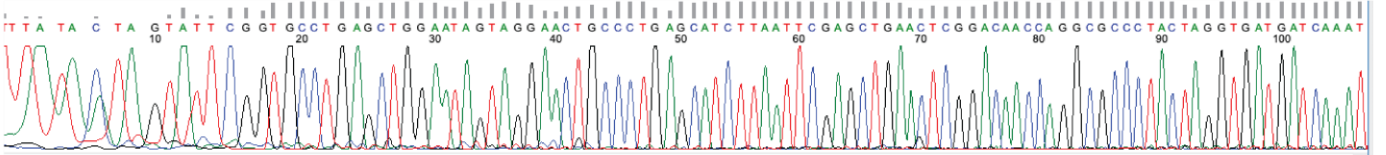
Fig 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % donde se muestra los amplicones del gen mitocondrial COI. MM: marcador molecular de 100 pb; C-: control negativo; muestras con número de catálogo de la CNMA: 47066 (*S. ventralis*), 49312 (*C. magnus*), 49344 (*C. mexicanus*), 49345 (*C. mexicanus*), 49400 (*S. veraepacis*), 49401 (*S. veraepacis*), 49393 (*S. ventralis*) y 49392 (*S. ventralis*).

Fig 5. Ejemplo de tres electroferogramas obtenidos para tres distintas especies estudiadas.

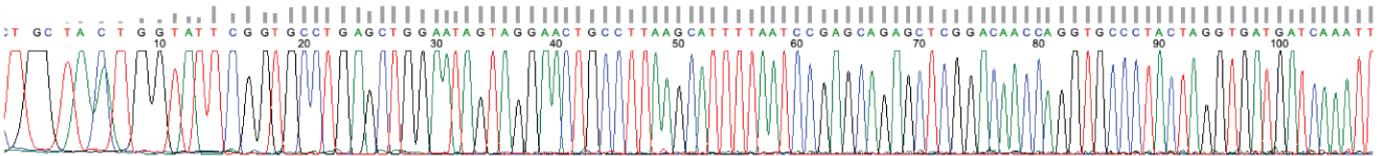
47066 *Sorex ventralis*



47064 *Cryptotis peregrinus*



49312 *Cryptotis magnus*



4.3 Distancias genéticas

Por medio de la matriz se obtuvieron los promedios de distancias, los primeros promedios corresponden a las distancias entre ejemplares de la misma especie (Cuadro 5). Incluyendo a especies hermanas se sacaron las distancias interespecíficas, en el caso de *Sorex ventralis* y *S. veraepacis* se consideró a *S. veraecrucis* para obtener los promedios (Cuadro 6). Considerando únicamente nuestras secuencias, se promediaron las distancias entre las especies estudiadas de *Cryptotis* y *Sorex* (Cuadro 7). También se calcularon los promedios de distancias entre algunas especies del orden Eulipothyplha, en las que se incluyó a ejemplares de la subfamilia Crocidurinae, de las familias Erinaceidae y Talpidae, así como del orden externo Chiroptera (Cuadro 8).

Cuadro 5. Promedios de distancias genéticas obtenidos entre ejemplares de la misma especie, las distancias están ajustadas con el modelo de sustitución K2P y se expresan en %.

ESPECIE	DISTANCIA GENÉTICA INTRAESPECIFICA (%)
<i>Cryptotis magnus</i>	0
<i>Cryptotis mexicanus</i>	1.8
<i>Cryptotis peregrinus</i>	3.9
<i>Cryptotis pueblensis</i>	0
<i>Sorex ventralis</i>	0.5
<i>Sorex veraepacis</i>	63.6

Cuadro 6. Promedios de distancias genéticas obtenidos entre especies hermanas de musarañas, las distancias están ajustadas con el modelo de sustitución K2P y se expresan en %.

ESPECIE	DISTANCIA GENÉTICA INTERESPECIFICA (%)
<i>Cryptotis magnus</i> - <i>C. phillipsii</i>	5.6
<i>Cryptotis mexicanus</i> - <i>C. obscurus</i>	3.8
<i>Cryptotis peregrinus</i> - <i>C. goldmani</i>	1.3
<i>Sorex ventralis</i> - <i>S. veraecrucis</i>	8.9
<i>Sorex veraepacis</i> - <i>S. veraecrucis</i>	76.7

Cuadro 7. Promedios de distancias genéticas obtenidos de distintas especies de musarañas de los géneros *Cryptotis* y *Sorex*, las distancias están ajustadas con el modelo de sustitución K2P y se expresan en %.

ESPECIE	<i>Cryptotis magnus</i>	<i>Cryptotis mexicanus</i>	<i>Cryptotis peregrinus</i>	<i>Cryptotis pueblensis</i>	<i>Sorex ventralis</i>
<i>Cryptotis mexicanus</i>	14.6				
<i>Cryptotis peregrinus</i>	13.6	11.7			
<i>Cryptotis pueblensis</i>	16.8	17.4	13.6		
<i>Sorex ventralis</i>	27.1	24.7	25.5	26.3	
<i>Sorex veraepacis</i>	76.9	76.9	72.5	77.4	76.1

Cuadro 8. Promedios de distancias genéticas obtenidos entre especies de musarañas y especies de los géneros *Blarina* y *Megasorex*, así como entre especies de la subfamilia Crocidurinae, de la familia Erinaceidae y Talpidae y del Orden Chiroptera. Las distancias están ajustadas con el modelo de sustitución K2P y se expresan en %.

	<i>Blarina brevicauda</i>	<i>Megasorex gigas</i>	Crocidurinae	Erinaceidae	Talpidae	Chiroptera
<i>Cryptotis magnus</i>	19.7	23.7	24.2	29.8	24.2	25.8
<i>Cryptotis mexicanus</i>	17.2	21.4	22.8	28.5	24.0	26.0
<i>Cryptotis peregrinus</i>	16.7	21.9	21.8	27.5	23.6	23.8
<i>Cryptotis pueblensis</i>	20.4	24.2	20.5	26.3	24.0	29.3
<i>Sorex ventralis</i>	19.8	22.4	22.2	22.6	24.0	26.6
<i>Sorex veraepacis</i>	75.7	80.2	81.0	83.8	85.7	88.3
TOTAL	28.2	32.3	32.0	36.4	34.2	36.6

4.4 Árbol de distancias

En el árbol de distancias o Neighbor-Joining se puede observar la formación de distintos grupos o clusters, los cuales de manera general pueden ser identificados por especie, género, familia y orden (Fig. 6). Como grupo externo se mantiene el orden Chiroptera. En el árbol se aprecian de manera clara los clusters correspondientes a las familias Erinaceidae, Talpidae y Soricidae. Las subfamilias Crocidurinae y Soricinae se encuentran ubicadas dentro del grupo correspondiente a la familia Soricidae. En el cluster correspondiente a la subfamilia Soricinae es posible observar dos subgrupos principales en los que podemos encontrar a los géneros *Sorex* y *Cryptotis*. De las 15 secuencias, 7 se agruparon dentro del cluster del género *Sorex* y corresponden a las especies *S. ventralis* y *S. veraepacis*. Por otra parte, dentro del cluster de *Cryptotis* tenemos agrupadas a las 8 secuencias restantes de las especies *C. magnus*, *C. mexicanus*, *C. peregrinus* y *C. pueblensis*.

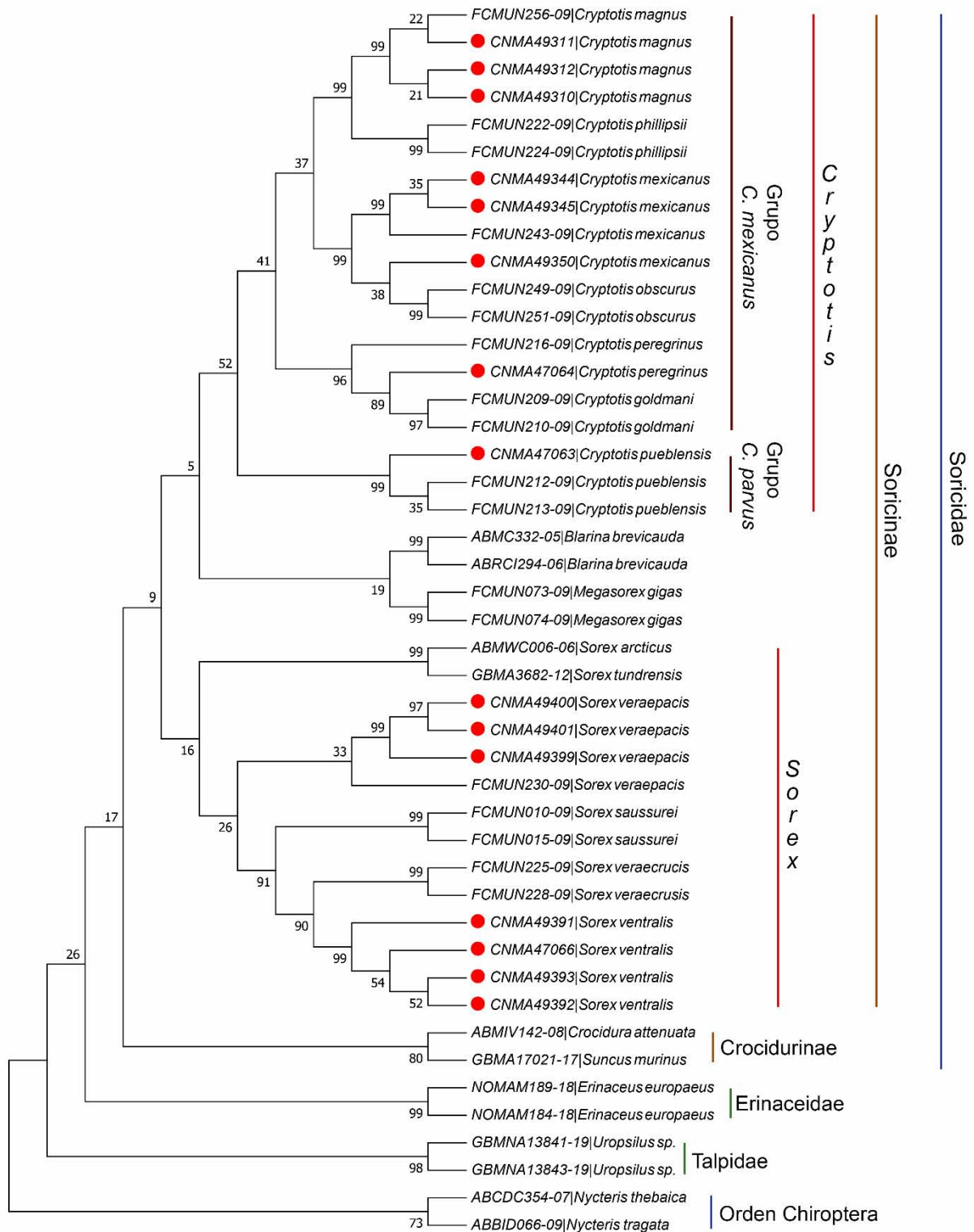


Fig 6. Árbol Neighbor-Joining construido con 45 secuencias de distintas especies de musarañas de los géneros *Cryptotis* y *Sorex*, de la subfamilia Crocidurinae, las familias Erinaceidae y Talpidae y del Orden Chiroptera. Las distancias fueron corregidas por el modelo de sustitución K2P. Los valores de Bootstrap dados por 1100 réplicas se indican al final de las ramas. ●: Secuencias elaboradas en este trabajo.

4.5 BOLD Systems

En la plataforma de BOLD Systems se creó un nuevo proyecto titulado EUL Mexican shrews donde se incluyeron los datos taxonómicos y de colecta de los 15 ejemplares seleccionados. También, se subieron fotos de cada ejemplar voucher, todas las secuencias consenso y los electroferogramas obtenidos.

V. DISCUSIÓN

Desde que el código de barras de DNA se propuso como herramienta en la identificación de especies, el gen mitocondrial COI ha sido uno de los marcadores moleculares más comúnmente utilizado para este propósito, particularmente en animales. La eficacia del COI se ha comprobado en previas ocasiones, tal es el caso de Hebert *et al.* (2003a) quienes al trabajar con 150 individuos del orden Lepidoptera lograron identificar correctamente al 100% de los individuos.

Posteriormente, Hajibabaei *et al.* en el 2007 consiguieron identificar al 96.7% de los ejemplares de murciélagos estudiados. Por otro lado, también existen excepciones en las que este marcador molecular no ha sido del todo eficaz (p. ej.: cnidarios, anfibios y reptiles) y ha sido necesario aplicar otros marcadores como es el caso del gen *cyt b* (Hebert *et al.*, 2003b; Kress *et al.*, 2014). Con la elaboración de los códigos de barras de DNA no se pretende reemplazar a los métodos de identificación morfológicos, sino implementar una herramienta que permita complementar y facilitar las identificaciones taxonómicas de especies o de ejemplares de musarañas que en ocasiones pueden resultar confusas y poco claras.

5.1 Fenograma y distancias genéticas

Algunos de los principales requisitos para que una secuencia genética sea incluida en una base de datos son que la secuencia en cuestión esté asociada a un cluster o grupo de especies emparentadas, esperando que esta asignación coincida con su identificación propiamente dicha. Otro requisito es que la distancia genética intraespecífica sea menor a la distancia interespecífica, esto quiere decir, que dos ejemplares de la misma especie tengan una distancia genética menor entre ellos,

que la que tienen con ejemplares de otras especies. Cabe mencionar que las secuencias obtenidas en el presente trabajo cumplieron con ambos requisitos.

Para empezar, en el fenograma de distancias genéticas o NJ se muestra como las 15 secuencias obtenidas se agrupan conforme a su identidad taxonómica. Es importante recordar que los árboles NJ no representan como tal una filogenia sino la similitud entre las distancias genéticas, esto se debe a que el método NJ no considera la relación entre ancestro y descendiente, ni el principio de descendencia con modificación (Saitou y Nei,1987; Vera *et al.*, 2012).

Las secuencias de *Sorex ventralis* y *Sorex veraepacis* se ubicaron acorde a su identificación previa. Es importante remarcar que las secuencias de *S. ventralis* obtenidas en este trabajo son las primeras de la especie en ser incluidas dentro de BOLD. Tampoco fue posible encontrar secuencias de *S. oreopolus* y *S. macrodon*, especies que en trabajos previos han sido consideradas hermanas de *S. ventralis* y *S. veraepacis*, respectivamente (Esteva *et al.*, 2010). Por este motivo, se buscaron secuencias de otras especies, como lo fueron *S. saussurei* y *S. veraecrucis* (Esteva *et al.*,2010). Con el objetivo de conformar el cluster perteneciente al subgénero *Sorex* se incluyeron las secuencias de *S. arcticus* y *S. tundrensis* (Fumagalli *et al.*, 1998; Ohdachi *et al.*, 2006).

En referencia a las distancias genéticas que fueron obtenidas, se puede apreciar el caso particular de *Sorex veraepacis* para el cual los valores promedio fueron considerablemente mayores a los de las demás especies. El promedio para la distancia intraespecífica es de 63.6 %, mientras que para la distancia interespecífica es de 76.7 %. A pesar de esto, la distancia intraespecífica sigue

siendo menor al valor de la distancia interespecífica, por lo que las secuencias de *S. veraepacis* siguen cumpliendo con el requisito mencionado anteriormente y de acuerdo con Hebert *et al.* (2003b), si una secuencia muestra distancias o divergencias altas no se debe comprometer su uso en la identificación de especies.

Se pueden apreciar en el cluster del género *Cryptotis* dos clados diferentes que corresponden a dos de los seis grupos de los cuales se compone el género (Woodman, 2005; Guevara y Cervantes, 2014, Woodman, 2018). Uno de los grupos corresponde al de *Cryptotis parvus* donde se ubica una de las secuencias y el otro grupo a *C. mexicanus* con 7 secuencias. En el grupo de *C. parvus* se encuentra la secuencia que fue identificada como *C. pueblensis* ubicándose junto a otras dos secuencias de la misma especie obtenidas de BOLD. Por otro lado, dentro del grupo correspondiente a *C. mexicanus* se encuentran tres secuencias de *C. magnus*, las cuáles se sitúan en la misma rama junto a otra secuencia de la misma especie, concordando con su previa identificación. Dentro del mismo clado se observa la presencia de *C. phillipsii*, especie hermana de *C. magnus* (Guevara y Cervantes, 2014).

En otro clado del grupo de *C. mexicanus* se observan tres secuencias identificadas morfológicamente como *C. mexicanus* y otras de *C. obscurus* obtenidas de BOLD. En el fenograma se muestra como dos de estas secuencias se ubican junto a otra secuencia descargada de *C. mexicanus*; la otra secuencia identificada como *C. mexicanus* se encuentra localizada en una rama diferente a la de las anteriores y más cercana a la correspondiente a la especie *C. obscurus*. Este resultado puede ser explicado bajo la premisa de que ambas especies son hermanas e incluso a *C. mexicanus* se le consideraba especie politípica en la cual

se incluía a *C. obscurus* como una subespecie de esta (Guevara y Cervantes, 2014). También se ha observado que entre estas dos especies existe gran similitud morfológica y de acuerdo con otros estudios, los datos genéticos sugieren que entre las poblaciones de estas especies no existe una marcada diferencia (Guevara y Sánchez-Cordero, 2018). Sin embargo, en referencia a las distancias genéticas, se obtuvo un valor de 1.8 % en la distancia intraespecífica y de 3.8 % en la distancia interespecífica obtenida entre ambas especies. Estas distancias concuerdan con la ubicación de las secuencias de *C. mexicanus* dentro del árbol.

Dentro del grupo *C. mexicanus* se observa el clado correspondiente al subgrupo *C. goldmani* y es aquí donde se sitúa la secuencia CNMA47064 identificada como *C. peregrinus* junto con otra secuencia de la misma especie y dos de su especie hermana *C. goldmani*. La secuencia CNMA47064 está ubicada entre *C. peregrinus* y *C. goldmani*, mostrando una distancia promedio de 3.9 % con la secuencia de su misma especie y de 2.6 % con las secuencias de *C. goldmani*. A pesar de este resultado, morfológicamente el ejemplar CNMA47064 fue identificado como *C. peregrinus*. Aunque ambas especies sean semejantes morfológicamente, la identificación fue realizada gracias a que el cuarto diente fue claramente visible en vista lateral, dicho carácter morfológico es utilizado para diferenciar a *C. peregrinus* de otras especies (Carraway, 2007). Previamente se ha registrado que entre las especies hermanas *C. peregrinus* y *C. goldmani* las distancias interespecíficas llegan a ser bajas (1.4%) en ejemplares de localidades distantes, además, aún no se tiene muy en claro el estatus taxonómico, ni los límites filogenéticos entre ambas especies (Woodman y Timm, 2000; Guevara y Cervantes, 2014).

En lo que concierne al resto del árbol se puede observar como la ubicación de los grupos externos coincide con lo obtenido en trabajos filogenéticos anteriores. Las secuencias de *Blarina* y *Megasorex* se ubican junto a *Cryptotis* y *Sorex* en el clado correspondiente a la subfamilia Soricinae; en otro clado se muestra a la subfamilia Crocidurinae junto a la familia Erinaceidae y en una rama distinta a la familia Talpidae (Douady *et al.*, 2002; Ohdachi *et al.*, 2005; Guevara y Cervantes, 2014). Para la elección del orden externo se tomó como referencia a Dubey *et al.* (2007) quienes utilizaron al orden Chiroptera como grupo externo en la realización de una filogenia molecular, en su estudio, se ocupó una especie del suborden Microchiroptera (*Pipistellus pipistellus*). En años anteriores, Murphy *et al.* (2001) y Springer *et al.* (2004) habían sugerido a Chiroptera como el orden hermano de Eulipotyphla por lo que su uso como grupo externo resultó adecuado para el presente trabajo.

Los resultados muestran que las distancias intraespecíficas en su mayoría resultaron inferiores a las interespecíficas, cumpliendo así con uno de los requisitos mencionados al comienzo. Las distancias intraespecíficas presentan valores que oscilan entre el 0% en especies como *Cryptotis magnus* y *C. pueblensis* a 3.9 % en *C. peregrinus*, teniendo un promedio de 1.26 %. Si se analiza el promedio de *Sorex veraepacis* junto con el de las demás especies, el promedio total aumenta de 1.26 a 10.9%.

Los valores obtenidos en algunos casos resultan superiores en contraste a los valores conseguidos por Hebert *et al.* (2003b) los que en su mayoría fueron inferiores al 1%. En su estudio analizaron la eficacia del gen COI en diversos grupos de animales (principalmente invertebrados) y mencionan que los valores en

las distancias intraespecíficas frecuentemente son inferiores al 2%. Al comparar los datos aquí obtenidos con los de otros trabajos realizados en mamíferos, se pueden apreciar más similitudes. Por ejemplo, Borisenko *et al.* en el 2008 obtuvieron valores de 0 a 5.3% con un promedio de 1% en ejemplares de la misma especie de murciélagos y roedores; en el trabajo elaborado por Cervantes *et al.* (2010) reportan valores promedio de 1.56% (0.5-2.2%) en la especie *Didelphis virginiana* y de 1.65% (0.2-2.7%) en *D. marsupialis*. Por su parte, Jaquet *et al.* (2012) trabajaron con musarañas colectadas en Guinea y obtuvieron distancias intraespecíficas de 0 a 2.9%, con un promedio total de 0.7%.

En el caso de las distancias interespecíficas, exceptuando a *C. peregrinus*, los valores obtenidos son mayores en comparación a las distancias intraespecíficas. La distancia más baja fue de 3.8% (*C. mexicanus* - *C. obscurus*) y la más alta de 8.9% (*S. ventralis* - *S. vereacrusis*) en especies hermanas. Estos valores fueron ligeramente menores en contraste a los obtenidos en trabajos como el de Borisenko *et al.* (2008) en el que reportan un promedio de 10.1% entre especies del mismo género, al igual que en el de Cervantes *et al.* (2010) donde registraron valores de 7.8 a 9.3% entre dos especies congéneres de *Didelphis*. Por otro lado, Jaquet *et al.* (2012) obtuvieron distancias interespecíficas de 4.4 - 24.7% con un promedio de 17.8% en distintas especies de musarañas del género *Crocidura*.

Las identificaciones previas basadas únicamente en caracteres morfológicos y la obtenidas mediante el uso del COI bastaron para identificar hasta nivel de especie a 14 ejemplares. En 12 ejemplares las identificaciones por medio de las secuencias genéticas coincidieron con la identificación morfológica que se tenía registrada y en otros dos ejemplares la identificación previa no coincidía con lo

obtenido de las distancias genéticas del COI. Después de una revisión morfológica del cráneo y la piel de los ejemplares voucher, de las búsquedas en BLAST, de las distancias genéticas y de la elaboración del árbol NJ se logró identificar correctamente a los ejemplares CNMA 47063 y CNMA 47064 como *Cryptotis pueblensis* y *Sorex ventralis* respectivamente. En contraste se encuentra el ejemplar de *C. peregrinus* siendo el único dónde la aplicación del gen mitocondrial COI no resultó del todo eficaz. Recordemos que en algunas ocasiones este gen no consigue identificar con precisión especies filogenéticamente cercanas (Hebert y Gregory, 2005; Márquez, 2015); por este motivo es importante seguir trabajando a nivel molecular y morfológico para poder esclarecer la taxonomía de esta familia e incluso implementar el uso de otros marcadores moleculares que permitan una mayor eficiencia del uso del código de barras de DNA en especies de musarañas.

Las secuencias obtenidas fueron incluidas en la base de datos “The Barcode of Life Data Systems (BOLD)”, la cual es una plataforma en la que se almacenan y publican los códigos de barras de DNA. Pero antes de que cualquier secuencia sea aceptada debe analizarse y cumplir con los requisitos mencionados anteriormente; uno de esos requisitos es que la secuencia o código de barras tiene que estar asociado a un ejemplar voucher vinculado a una institución (Vera *et al.*, 2012; Galimberti *et al.*, 2015). En nuestro caso todas las secuencias cuentan con su ejemplar voucher y se encuentran catalogados en la CNMA.

Finalmente, es importante reiterar la utilidad de los códigos de barras al momento de llevar a cabo identificaciones taxonómicas, principalmente en aquellas especies en las cuales existen problemas al momento de identificar, como es el caso de las musarañas. Por esta razón, los códigos de barras y los ejemplares

voucher generados en este trabajo representan una nueva contribución a la investigación de esta familia y resultan de gran importancia ya que dan pauta a la realización de más trabajos con el objetivo de ampliar el conocimiento de las musarañas.

VI. CONCLUSIONES

Cumpliendo el objetivo general del trabajo, se generaron 15 códigos de barras de DNA de distintas especies de musarañas pertenecientes a dos localidades del estado de Oaxaca.

Las secuencias del gen mitocondrial COI generadas en este trabajo cumplieron con los requisitos requeridos. Las distancias intraespecíficas resultaron menores a las distancias interespecíficas, además, la posición de las secuencias dentro del fenograma coincidió con su identificación.

Se generó en BOLD Systems el proyecto titulado EUL Mexican shrews donde se encuentran anexadas las secuencias consenso, los electroferogramas y fotos de los ejemplares voucher. Los ejemplares voucher se encuentran resguardados dentro de la Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM.

Recomendación

En el caso de algunas especies es recomendable ampliar el número y distribución de la muestra con la finalidad de tener una mejor representación de la variabilidad genética y morfológica de las especies.

LITERATURA CITADA

- ALTAMIRANO-BENAVIDES, M. Y P. YÁÑEZ. 2016. El código de barras de ADN (barcoding): Una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en el Ecuador. *Revista Ciencias de la Vida*. 23(1):13.
- BANNIKOVA, A.A., A.V. ABRAMOV, A.V. BORISENKO, V.S. LEBEDEV Y V.V. ROZHNOV. 2011. Mitochondrial diversity of the White-toothed shrews (Mammalia, Eulipotyphla, *Crocidura*) in Vietnam. *Zootaxa*. 2812:1-20.
- BORISENKO, A.V., B.K. LIM, N.V. IVANOVA, R.H. HANNER Y P.D.N. HEBERT. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*. 8:471-479.
- BRIONES-SALAS, M., M. CORTÉS-MARCIAL Y M. C. LAVARIEGA. 2015. Diversidad y distribución geográfica de los mamíferos terrestres del estado de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86:685-710.
- CARRAWAY, L.N. 2007. Shrews (Eulipotyphla: Soricidae) of Mexico. *Monographs of the Western North America Naturalist*. 3:1-91.
- CEBALLOS, G. Y J. ARROYO-CABRALES. 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México 2012. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época*. 1:27-80.
- CERVANTES, F.A., J. ARCANGELI, Y. HORTELANO-MONCADA Y A.V. BORISENKO. 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA*. 21(S1): 44-50.
- DOUADY, C.J., P.I. CHATELIER, O. MADSEN, W.W. DE JONG, F. CATZEFLIS, M.S. SPRINGER Y M.J. STANHOPE. 2002. Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 25: 200-209.
- DOUADY, C.J. Y J.P. DOUZERY. 2003. Molecular estimation of eulipotyphlan divergence times and the evolution of "Insectivora". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 28:285-296.
- DOUADY, C.J. Y J.P. DOUZERY. 2009. Hedgehogs, shrews, moles and solenodons (Eulipotyphla). pp. 495-498 En *The Timetree of Life*. Hedges, S.B. y S. Kumar (Eds). *Oxford University Press*. Nueva York, E.U.A.

- DUBEY, S., N. SALAMIN, S. D. OHDACHI, P. BARRIERE Y P. VOGEL. 2007. Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia: Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44:126-137.
- ESTEVA, M., F. A. CERVANTES, S. V. BRANT Y J. A. COOK. 2010. Molecular phylogeny of long-tailed shrews (genus *Sorex*) from México and Guatemala. *Zootaxa*. 2615: 47-65.
- GALIMBERTI, A., A. SANDIONIGI, A. BRUNO, A. BELLATI Y M. CASIRAGHI. 2015. DNA barcoding in mammals: what's new and where next?. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 26(1):13-24.
- GUEVARA, L. 2017. The can dig it: semifossorial habits of the Mexican small-eared shrew (Mammalia: *Cryptotis mexicanus*). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88(4):1003-1005.
- GUEVARA, L. Y F. A. CERVANTES. 2014. Molecular systematics of small-eared shrews (Soricomorpha, Mammalia) within *Cryptotis mexicanus* species group from Mesoamerica. *Acta Theriol.* 59:233-242.
- GUEVARA, L., F. A. CERVANTES Y V. SÁNCHEZ-CORDERO. 2015. Riqueza, distribución y conservación de los topos y las musarañas (Mammalia, Eulipotyphla) de México. *Therya*. 6(1):43-68.
- GUEVARA, L. Y V. SÁNCHEZ-CORDERO. 2018. Patterns of morphological and ecological similarities of small-eared shrews (Soricidae, *Cryptotis*) in tropical montane cloud forest from Mesoamerica. *Systematics and Biodiversity*. 16(6):551-564.
- HAJIBABAEI, M., G.A.A. SINGER, E.L. CLARE Y P.D.N. HEBERT. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*. 5:24.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

- HEBERT, P.D.N., A. CYWINSKA, S.L. BALL Y J.R. DE WAARD. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of Royal Society (Biological)*. 270:313-321.
- HEBERT, P.D.N., S. RATNASINGHAM Y J.R. DE WAARD. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of Royal Society (Biological)*. 270(Suppl.): S96-S99.
- HEBERT, P.D.N. Y T.R. GREGORY. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biologist*. 54(5):852-859.
- HUTTERER, R. 1985. Anatomical adaptations of shrews. *Mammal Rev*. 15(1):43-55
- IVANOVA, N.V., E.L. CLARE Y A.V. BORISENKO. 2012. DNA Barcoding in Mammals. pp. 153-182. En DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Kress, W. J. y D. L. Erickson (Eds). *Humana Press*. Nueva Jersey, E.U.A.
- JAUQUET, F., V. NICOLAS, C. BONILLO, C. CRUAUD Y C. DENYS. 2012. Barcoding, molecular taxonomy, and exploration of the diversity of shrews (Soricimorpha: Soricidae) on Mount Nimba (Guinea). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 166:672-687.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16:111-120.
- KRESS, W.J. Y D.L. ERICKSON. 2012. *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. *Humana Press*. 3-8.
- KRESS, W.J., C. GARCÍA-ROBLEDO, M. URIARTE Y D.L. ERICKSON. 2014. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 30(1):25-35.
- KUMAR, S., K. TAMURA Y M. NEI. 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*. 10(2):189-191.
- MÁRQUEZ, B.C. 2015. Aplicación de los Códigos de Barras de DNA en el descubrimiento de la diversidad animal marina. *CICIMAR Oceanías*. 30(2):35-52.

- MURPHY, W.J., E. EIZIRIK, W.E. JOHNSON, Y.P. ZHANG, O.A. RYDER Y S.J. O'BRIEN. 2001. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*. 409:614-618.
- OHDACHI, S.D., M. HASEGAWA, M.A. IWASA, P. VOGEL, T. OSHIDA, L.K. LIN Y H. ABE. 2005. Molecular phylogenetics of soricid shrews (Mammalia) based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences: with special reference to the Soricinae. *Journal of Zoology*. 270:177-191.
- PAZ, A., M. GONZÁLEZ Y A. CRAWFORD. 2011. Códigos de Barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta biológica Colombiana*. 16(3):163-165.
- SAITOU, N. Y M. NEI. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425.
- SÁNCHEZ-CORDERO, V., F. BOTELLO, J.J. FLORES-MARTÍNEZ, R.A. GÓMEZ-RODRÍGUEZ, L. GUEVARA, G. GUTIÉRREZ-GRANADOS Y A. RODRÍGUEZ-MORENO. 2014. Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85:496-504.
- SANTOS, A., A.L. TRUJANO, J. CALDERÓN Y M. BRIONES. 2000. Topos y musarañas: animales misteriosos y poco conocidos. CONABIO. *Biodiversitas*. 32:11-15.
- SANTOS-MORENO, A. 2014. Los mamíferos del Estado de Oaxaca. *Revista Mexicana de Mastozoología*. 2:18-32.
- SPRINGER, M.S, G.C. CLEVEN, O. MADSEN, W.W. DE JONG, V.G. WADDELL, H.M. AMRINE Y M.J. STANHOPE. 1997. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree. *Nature*. 388:61-64.
- SPRINGER, M.S., M.J. STANHOPE, O. MADSEN Y W.W. DE JONG. 2004. Molecular consolidate the placental mammal tree. *Trends in Ecology and Evolution*. 19(8):430-438.
- STANHOPE, M.J, V.G. WADDELL, O. MADSEN, W.W. DE JONG, S.B. HEDGES, G.C. CLEVEN, D. KAO Y M.S. SPRINGER. 1997. Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African

insectivore mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Sci.* 95:9967-9972.

SYMONDS, M.R.E. 2005. Phylogeny and life histories of the 'Insectivora': controversies and consequences. *Biological Reviews.* 80:93-128.

VERA, S. P.M., P.M. JIMÉNEZ Y L. FRANCO-LARA. 2012. Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias "DNA Barcode" para la identificación a nivel de especie. *Revista Facultad de Ciencias Básicas.* 8(2):196-209.

WILLOWS-MUNRO, S. Y C.A. MATTHEE. 2011. Exploring the diversity and molecular evolution of shrews (family Soricidae) using mtDNA cytochrome b data. *African Zoology.* 46(2):246-262.

WOODMAN, N. 2005. Evolution and Biogeography of Mexican small-eared shrews of the *Cryptotis mexicana*-group (Insectivora: Soricidae). Cap 42:523-534. En Contribuciones Mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa. Sánchez-Cordero, V. y R.A. Medellín (Eds). *Instituto de Biología, UNAM, Instituto de Ecología, UNAM; CONABIO.* México. 706 p.

WOODMAN, N. 2018. American Recent Eulipotyphla: Nesophontids, Solenodons, Moles, and Shrews in the New World. *Smithsonian Contributions to Zoology* 650. Washington, U.S.A. 107 p.

WOODMAN, N. Y R.M. TIMM. 2000. Taxonomy and evolutionary relationships of Phillips' small-eared shrew, *Cryptotis phillipsii* (Schaldach, 1966), from Oaxaca, Mexico (Mammalia: Insectivora: Soricidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington.* 113(2):339-355.

APÉNDICES

Apéndice 1. Ejemplares utilizados en el presente trabajo de musaraña (Eulipothyphla: Soricidae) pertenecientes al estado de Oaxaca, México. CATCO: número de catálogo de la Colección Nacional de Mamíferos; CATPE: número de catálogo personal de Fernando A. Cervantes; ELEV: elevación; PR: preservación; PE: piel y esqueleto, SE: solo esqueleto.

CATCO	CATPE	SEXO	ESPECIE	LOCALIDAD	ELEV	LATITUD	LONGITUD	FECHA	PR
49311	5636	M	<i>Cryptotis magnus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	29.07.2017	PE
49312	5658	M	<i>Cryptotis magnus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	01.08.2017	PE
49310	5629	M	<i>Cryptotis magnus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	28.07.2017	PE
49344	5640	M	<i>Cryptotis mexicanus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	29.07.2017	PE
49345	5646	M	<i>Cryptotis mexicanus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	30.07.2017	PE
49350	5648	H	<i>Cryptotis mexicanus</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	31.07.2017	PE
47063	4986	M	<i>Cryptotis pueblensis</i>	OAXACA: Sta. Inés del Monte, Mpio. Sta. Inés del Monte	2347	16°55'28''	96°52'30''	25.08.2013	PE
47064	4990	H	<i>Cryptotis peregrinus</i>	OAXACA: Sta. Inés del Monte, Mpio. Sta. Inés del Monte	2347	16°55'28''	96°52'30''	26.08.2013	PE
47066	5016	H	<i>Sorex ventralis</i>	OAXACA: Sta. Inés del Monte, Mpio. Sta. Inés del Monte	2347	16°55'28''	96°52'30''	28.08.2013	PE
49393	5661	M	<i>Sorex ventralis</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	01.08.2017	PE
49392	474	M	<i>Sorex ventralis</i>	OAXACA: 9.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2550	17°12'12''	96°37'36''	06.07.2017	PE
49391	502	H	<i>Sorex ventralis</i>	OAXACA: 9.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2550	17°12'12''	96°37'36''	04.07.2017	SE
49400	5641	M	<i>Sorex veraepacis</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	29.07.2017	PE
49401	5642	M	<i>Sorex veraepacis</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	29.07.2017	PE
49399	5631	H	<i>Sorex veraepacis</i>	OAXACA: 10.7 KM SW Sta. Catarina Ixtepeji, Mpio. Sta. Catarina Ixtepeji	2800	17°11'37''	96°37'42''	28.07.2017	PE

Apéndice 2. Secuencias del gen de la subunidad I del citocromo oxidasa *c* (COI) de distintas especies del orden Eulipotyphla y Chiroptera obtenidas de BOLD Systems.

NO. DE ACCESO	ORDEN	FAMILIA	ESPECIE	LOCALIDAD	MUSEO ID	COLECCIÓN
FCMUN209-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis goldmani</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44678	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN210-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis goldmani</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44679	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN256-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis magnus</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:43061	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN243-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis mexicanus</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:43057	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN249-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis obscurus</i>	México: Tamaulipas	IBUNAM:CNMA:44624	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN251-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis obscurus</i>	México: Tamaulipas	IBUNAM:CNMA:44629	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN216-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis peregrinus</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:45584	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN222-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis phillipsii</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44726	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN224-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis phillipsii</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44728	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN225-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex veraecrucis</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44742	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN228-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex veraecrucis</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44740	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCNUN230-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex veraepacis</i>	México: Oaxaca	IBUNAM:CNMA:44744	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN010-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex saussurei</i>	México: Ciudad de México	IBUNAM:CNMA:43368	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN015-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex saussurei</i>	México: Ciudad de México	IBUNAM:CNMA:44061	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
ABMC332-05	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Blarina brevicauda</i>	Canadá: Chappleau, Ontario	HLC-10663	Centre for Biodiversity Genomics
ABRCI294-06	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Blarina brevicauda</i>	Canadá: Snowball, 16th Sideroad, Ontario	ROM:MAM:109695	Royal Ontario Museum

FCMUN073-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Megasorex gigas</i>	México: Guerrero	IBUNAM:CNMA:45721	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN074-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Megasorex gigas</i>	México: Jalisco	IBUMAN:CNMA:42923	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
GBMNA13841-19	Eulipotyphla	Talpidae	<i>Uropsilus sp.</i>			
GBMNA13843-19	Eulipotyphla	Talpidae	<i>Uropsilus sp.</i>			
NOMAM189-18	Eulipotyphla	Erinaceidae	<i>Erinaceus europaeus</i>	Noruega: Ostfold, Hobol	NHMO-DMA-667	Natural History Museum, Univesity of Oslo
NOMAM184-18	Eulipotyphla	Erinaceidae	<i>Erinaceus europaeus</i>	Noruega: Ostfold, Hobol	NHMO-DMA-81	Natural History Museum, Univesity of Oslo
ABMWC006-06	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex arcticus</i>	Canadá:Alberta, Kananaski	ROM:118688	Biodiversity Institute of Ontario Zoological Institute, Russian Academy of Sciences
GBMA3682-12	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Sorex tundrensis</i>	Estados Unidos:Alaska, Anchorage, Eagle River	St NED434/2008	
FCMUN212-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis parvus</i>	México: Oaxaca	IBUMAN:CNMA:44706	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
FCMUN213-09	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Cryptotis parvus</i>	México: Oaxaca	IBUMAN:CNMA:44707	Colección Nacional de Mamíferos, IBUNAM
ABMIV142-08	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Crocidura attenuata</i>	Vietnam:Quang Nam, Ngoc Linh	91226	Zoological Institute, Russian Academy of Sciences
GBMA17021-17	Eulipotyphla	Soricidae	<i>Suncus murinus</i>	China	KM497424	Institute of Biology, University of the Philippines Diliman
ABCDC354-07	Chiroptera	Nycteridae	<i>Nycteris thebaica</i>	Kenya: Coast, Tsavo West Camp	07IVK-894	Nacional Museums of Kenya
ABBID066-09	Chiroptera	Nycteridae	<i>Nycteris tragata</i>	Indonesia:Lampung, Way Cangkuk	MZB_31482	Museum Zoologicum Bogoriense, Cibinong Science Centre

Apéndice 3. Matriz de distancias genéticas entre distintas especies de musarañas, otros miembros de la familia Soricidae, del orden Eulipotyphla y del grupo externo (Chiroptera). Las distancias fueron obtenidas mediante el modelo de sustitución de K2P.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1 FCMUN256-09 <i>Cryptotis_magnus</i>																						
2 CNMA49311 <i>Cryptotis_magnus</i>	0,000																					
3 CNMA49312 <i>Cryptotis_magnus</i>	0,000	0,000																				
4 CNMA49310 <i>Cryptotis_magnus</i>	0,000	0,000	0,000																			
5 FCMUN222-09 <i>Cryptotis_phillipsii</i>	0,056	0,056	0,056	0,056																		
6 FCMUN224-09 <i>Cryptotis_phillipsii</i>	0,056	0,056	0,056	0,056	0,000																	
7 FCMUN243-09 <i>Cryptotis_mexicanus</i>	0,153	0,153	0,153	0,153	0,144	0,144																
8 CNMA49344 <i>Cryptotis_mexicanus</i>	0,153	0,153	0,153	0,153	0,144	0,144	0,000															
9 CNMA49345 <i>Cryptotis_mexicanus</i>	0,153	0,153	0,153	0,153	0,144	0,144	0,000	0,000														
10 CNMA49350 <i>Cryptotis_mexicanus</i>	0,133	0,133	0,133	0,133	0,132	0,132	0,035	0,035	0,035													
11 FCMUN249-09 <i>Cryptotis_obscurus</i>	0,150	0,150	0,150	0,150	0,132	0,132	0,039	0,039	0,039	0,036												
12 FCMUN251-09 <i>Cryptotis_obscurus</i>	0,150	0,150	0,150	0,150	0,132	0,132	0,039	0,039	0,039	0,036	0,000											
13 FCMUN216-09 <i>Cryptotis_peregrinus</i>	0,128	0,128	0,128	0,128	0,140	0,140	0,132	0,132	0,132	0,117	0,133	0,133										
14 CNMA47064 <i>Cryptotis_peregrinus</i>	0,136	0,136	0,136	0,136	0,132	0,132	0,116	0,116	0,116	0,117	0,125	0,125	0,039									
15 FCMUN209-09 <i>Cryptotis_goldmani</i>	0,140	0,140	0,140	0,140	0,144	0,144	0,109	0,109	0,109	0,117	0,125	0,125	0,039	0,013								
16 FCMUN210-09 <i>Cryptotis_goldmani</i>	0,140	0,140	0,140	0,140	0,144	0,144	0,109	0,109	0,109	0,117	0,125	0,125	0,039	0,013	0,000							
17 CNMA47063 <i>Cryptotis_pueblensis</i>	0,168	0,168	0,168	0,168	0,159	0,159	0,175	0,175	0,175	0,171	0,180	0,180	0,148	0,136	0,144	0,144						
18 FCMUN212-09 <i>Cryptotis_parvus</i>	0,168	0,168	0,168	0,168	0,159	0,159	0,175	0,175	0,175	0,171	0,180	0,180	0,148	0,136	0,144	0,144	0,000					
19 FCMUN213-09 <i>Cryptotis_parvus</i>	0,168	0,168	0,168	0,168	0,159	0,159	0,175	0,175	0,175	0,171	0,180	0,180	0,148	0,136	0,144	0,144	0,000	0,000				
20 ABMC332-05 <i>Blarina_brevicauda</i>	0,196	0,196	0,196	0,196	0,205	0,205	0,174	0,174	0,174	0,178	0,174	0,174	0,166	0,171	0,162	0,162	0,204	0,204	0,204			
21 ABRCI294-06 <i>Blarina_brevicauda</i>	0,197	0,197	0,197	0,197	0,205	0,205	0,166	0,166	0,166	0,174	0,174	0,174	0,158	0,163	0,154	0,154	0,205	0,205	0,205	0,006		
22 FCMUN073-09 <i>Megasorex_gigas</i>	0,235	0,235	0,235	0,235	0,217	0,217	0,208	0,208	0,208	0,221	0,221	0,221	0,234	0,221	0,226	0,226	0,226	0,226	0,226	0,226	0,188	0,192
23 FCMUN074-09 <i>Megasorex_gigas</i>	0,239	0,239	0,239	0,239	0,247	0,247	0,212	0,212	0,212	0,225	0,225	0,225	0,217	0,217	0,212	0,212	0,257	0,257	0,257	0,192	0,192	
24 CNMA47066 <i>Sorex_ventralis</i>	0,273	0,273	0,273	0,273	0,279	0,279	0,252	0,252	0,252	0,243	0,234	0,234	0,248	0,257	0,252	0,252	0,271	0,271	0,271	0,196	0,204	
25 CNMA49393 <i>Sorex_ventralis</i>	0,268	0,268	0,268	0,268	0,274	0,274	0,247	0,247	0,247	0,238	0,229	0,229	0,243	0,252	0,248	0,248	0,262	0,262	0,262	0,191	0,200	
26 CNMA49392 <i>Sorex_ventralis</i>	0,268	0,268	0,268	0,268	0,274	0,274	0,247	0,247	0,247	0,238	0,229	0,229	0,243	0,252	0,248	0,248	0,262	0,262	0,262	0,191	0,200	
27 CNMA49391 <i>Sorex_ventralis</i>	0,273	0,273	0,273	0,273	0,279	0,279	0,252	0,252	0,252	0,243	0,234	0,234	0,248	0,257	0,252	0,252	0,257	0,257	0,257	0,196	0,204	
28 FCMUN230-09 <i>Sorex_veraepacis</i>	0,236	0,236	0,236	0,236	0,240	0,240	0,219	0,219	0,219	0,234	0,215	0,215	0,238	0,219	0,219	0,219	0,279	0,279	0,279	0,206	0,197	
29 CNMA49400 <i>Sorex_veraepacis</i>	0,637	0,637	0,637	0,637	0,693	0,693	0,603	0,603	0,603	0,636	0,627	0,627	0,626	0,602	0,594	0,594	0,687	0,687	0,687	0,628	0,613	
30 CNMA49401 <i>Sorex_veraepacis</i>	0,595	0,595	0,595	0,595	0,644	0,644	0,561	0,561	0,561	0,586	0,578	0,578	0,585	0,562	0,554	0,554	0,647	0,647	0,647	0,577	0,564	

31	CNMA49399 <i>Sorex veraepacis</i>	1,075	1,075	1,075	1,075	1,106	1,106	1,106	1,106	1,106	1,156	1,080	1,080	1,026	1,011	0,996	0,996	0,989	0,989	0,989	1,071	1,091
32	FCMUN010-09 <i>Sorex saussurei</i>	0,260	0,260	0,260	0,260	0,265	0,265	0,257	0,257	0,257	0,258	0,249	0,249	0,245	0,249	0,245	0,245	0,253	0,253	0,253	0,254	0,253
33	FCMUN015-09 <i>Sorex saussurei</i>	0,265	0,265	0,265	0,265	0,270	0,270	0,253	0,253	0,253	0,254	0,244	0,244	0,249	0,245	0,240	0,240	0,248	0,248	0,248	0,254	0,253
34	FCMUN225-09 <i>Sorex veraecrucis</i>	0,279	0,279	0,279	0,279	0,285	0,285	0,239	0,239	0,239	0,244	0,217	0,217	0,259	0,245	0,249	0,249	0,276	0,276	0,276	0,222	0,226
35	FCMUN228-09 <i>Sorex veraecrucis</i>	0,270	0,270	0,270	0,270	0,281	0,281	0,239	0,239	0,239	0,245	0,218	0,218	0,250	0,240	0,231	0,231	0,272	0,272	0,272	0,218	0,222
36	ABMWC006-06 <i>Sorex arcticus</i>	0,254	0,254	0,254	0,254	0,246	0,246	0,239	0,239	0,239	0,235	0,230	0,230	0,244	0,249	0,249	0,249	0,240	0,240	0,240	0,234	0,238
37	GBMA3682-12 <i>Sorex tundrensis</i>	0,268	0,268	0,268	0,268	0,263	0,263	0,221	0,221	0,221	0,217	0,221	0,221	0,234	0,234	0,234	0,234	0,254	0,254	0,254	0,216	0,220
38	ABMIV142-08 <i>Crocidura attenuata</i>	0,225	0,225	0,225	0,225	0,234	0,234	0,202	0,202	0,202	0,206	0,197	0,197	0,220	0,206	0,215	0,215	0,197	0,197	0,197	0,205	0,206
39	GBMA17021-17 <i>Suncus murinus</i>	0,259	0,259	0,259	0,259	0,268	0,268	0,248	0,248	0,248	0,262	0,252	0,252	0,239	0,230	0,234	0,234	0,212	0,212	0,212	0,231	0,222
40	NOMAM189-18 <i>Erinaceus europaeus</i>	0,298	0,298	0,298	0,298	0,298	0,298	0,288	0,288	0,288	0,280	0,275	0,275	0,256	0,275	0,275	0,275	0,263	0,263	0,263	0,259	0,264
41	NOMAM184-18 <i>Erinaceus europaeus</i>	0,298	0,298	0,298	0,298	0,298	0,298	0,288	0,288	0,288	0,280	0,275	0,275	0,256	0,275	0,275	0,275	0,263	0,263	0,263	0,259	0,264
42	GBMNA13841-19 <i>Uropsilus sp.</i>	0,246	0,246	0,246	0,246	0,260	0,260	0,255	0,255	0,255	0,246	0,260	0,260	0,238	0,251	0,247	0,247	0,251	0,251	0,251	0,261	0,252
43	GBMNA13843-19 <i>Uropsilus sp.</i>	0,238	0,238	0,238	0,238	0,238	0,238	0,229	0,229	0,229	0,225	0,229	0,229	0,216	0,221	0,221	0,221	0,229	0,229	0,229	0,247	0,238
44	ABCDC354-07 <i>Nycteris thebaica</i>	0,254	0,254	0,254	0,254	0,263	0,263	0,273	0,273	0,273	0,268	0,259	0,259	0,280	0,251	0,251	0,251	0,293	0,293	0,293	0,233	0,233
45	ABBID066-09 <i>Nycteris tragata</i>	0,263	0,263	0,263	0,263	0,263	0,263	0,248	0,248	0,248	0,248	0,239	0,239	0,253	0,226	0,234	0,234	0,294	0,294	0,294	0,267	0,267

22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

23 0,073
24 0,226 0,230
25 0,222 0,226 0,006
26 0,222 0,226 0,006 0,000
27 0,217 0,221 0,009 0,003 0,003
28 0,226 0,205 0,186 0,182 0,182 0,186
29 0,673 0,656 0,608 0,592 0,592 0,600 0,545
30 0,627 0,619 0,560 0,545 0,545 0,553 0,501 0,045
31 1,089 1,148 1,138 1,138 1,138 1,119 1,104 0,829 0,790
32 0,263 0,262 0,159 0,150 0,150 0,146 0,195 0,643 0,592 1,093

